

PARTIAL TRANSLATION OF JP 57-161650 A FOR IDS


- (19) Japanese Patent Office (JP)  
(12) Official Gazette (A)  
(11) Publication Number: Sho 57-161650  
(43) Date of Publication: October 5, 1982  
(51) Int. Cl. G01N 33/52  
31/22  
33/50

Number of Inventions: 2 (total 11 pages)

Request for Examination: Submitted

- (54) Test Tool for Determining Active Oxidant in Test Sample and Method for Manufacturing the Same  
(21) Application Number: Sho 57-39596  
(22) Date of Filing: March 15, 1982  
Claim for Priority (32) March 16, 1981 (33) United States (US)  
(31) 244044  
(72) Inventor: Allan Elmer BARKHEART  
[Translation of Address Omitted]  
(72) Inventor: Ann Marie TIDEMANN  
[Translation of Address Omitted]  
(71) Applicant: Miles Laboratories, Inc.  
[Translation of Address Omitted]  
(74) Representative: Patent Attorney Hajime TSUKUNI

[Page 313 bottom left col. line 6 – bottom right col. line 13]

1. A test tool that is useful for determining a presence of active oxidant in a test sample and resistant to an inhibition of ascorbate present in the sample,  
characterized in that the test tool is formed of a carrier matrix comprising an organic hydroperoxide,  
an indicator capable of providing a detectable response in the presence of the active oxidant and peroxide,  
a condensed ring compound having a Co(III) complex and the structural formula:  (wherein R is a substituted or unsubstituted carbocyclic or heterocyclic residue, with the ring having 4 to 7 carbon atoms).

2. The test tool according to claim 1, wherein the Co(III) complex is  $\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ , cobalt (III) acetylacetonato,  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_3$ ,  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{CO}]\text{NO}_3$ ,  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_4\text{CO}_3]\text{NO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  or a mixture thereof.
3. The test tool according to claim 1, wherein the compound is 6-methoxyquinoline, 5,6-benzoquinoline, 4-azafluorene, 10H-pyrido[3,2-b]-[1,4]benzothiazine, 6-hydroxyquinoline or a mixture thereof.
4. The test tool according to claim 1, wherein the Co(III) complex is  $\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ .
5. The test tool according to claim 1, wherein the compound is 6-methoxyquinoline.

[Page 317 top right col. line 11 – bottom left col. line 2]

The Co(III) complexes useful in the present invention include  $\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ , cobalt (III) acetylacetonato,  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_3$ ,  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{CO}_3]\text{NO}_3$ ,  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_4\text{CO}_3]\text{NO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  and others. Of course, it is understood that many other Co(III) complexes also are applicable to the present invention taught here.  $\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$  showed an excellent result and was found to be a preferable complex for reducing the inhibition of ascorbate. In a preferable mode of the present invention, the composition is composed of cumene hydroperoxide, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine and  $\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ .

\* \* \* \* \*

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭57—161650

⑪ Int. Cl.<sup>3</sup>

G 01 N 33/52

31/22

33/50

識別記号

庁内整理番号

6422—2G

6514—2G

6422—2G

⑬ 公開 昭和57年(1982)10月5日

発明の数 2

審査請求 有

(全 11 頁)

⑭ 試験試料中の過酸化活性物質を測定するための試験具及びその製造方法

⑮ 特 願 昭57—39596

⑯ 出 願 昭57(1982)3月15日

優先権主張 ⑰ 1981年3月16日 ⑱ 米国(US)

⑲ 244044

⑳ 発 明 者 アラン・エルマー・パークハート

アメリカ合衆国インディアナ4651

4エルクハート・ストーン・

クリーク・ドライブ51818

㉑ 発 明 者 アン・マリー・タイドマン  
アメリカ合衆国ミシガン49112  
エドワーズバーグ・モートン・  
ドライブ68570

㉒ 出 願 人 マイルス・ラボラトリーズ・イ  
ンコーポレーテッド  
アメリカ合衆国インディアナ4651  
5エルクハート・ミルトル・ス  
トリート1127ビー・オー・ボツ  
クス40

㉓ 代 理 人 弁理士 津国肇

明 細 書

1. 発明の名称

試験試料中の過酸化活性物質を測定するための試験具及びその製造方法


2. 特許請求の範囲

1. 試験試料中の過酸化活性物質の存在を測定するのに有用であり、試料中に存在するアスコルビン酸塩の妨害作用に対し抵抗性を有する試験具であつて、

該試験具が、

有機ヒドロペルオキシドと、

該過酸化活性物質及び過酸化物の存在下で検知可能な応答を与えることのできる指示薬と、

Co(Ⅱ) 錯体及び構造式： (ここで、Rは置換若しくは非置換の炭素環又は複素環系の残基で、該環は原子数4～7を有している。)を有する錯合環化合物とを包含した担体から成ることを特徴とする試験具。

2. 該 Co(Ⅱ) 錯体が、Co(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub>Cl<sub>2</sub>、コバルト(Ⅱ)ア

セチルアセトナト、[Co(NH<sub>3</sub>)<sub>5</sub>H<sub>2</sub>O]Cl<sub>2</sub>、[Co(NH<sub>3</sub>)<sub>5</sub>CO]NO<sub>3</sub>、[Co(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>CO<sub>2</sub>]<sub>2</sub>NO<sub>3</sub>・3H<sub>2</sub>O、又はそれらの混合物である特許請求の範囲第1項記載の試験具。

3. 該化合物が、6-メトキシキノリン、5,6-ベンゾキノリン、4-アザフルオレン、10H-ピリド[3,2-b]-[1,4]ベンゾチアジン、6-ヒドロキシキノリン又はそれらの混合物である特許請求の範囲第1項記載の試験具。

4. 該 Co(Ⅱ) 錯体が、Co(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub>Cl<sub>2</sub>である特許請求の範囲第1項記載の試験具。

5. 該化合物が、6-メトキシキノリンである特許請求の範囲第1項記載の試験具。

6. 試験試料中の過酸化活性物質の存在を測定するのに有用であり、試料中に存在するアスコルビン酸塩の妨害作用に対し抵抗性を有する試験具の製造方法であつて、


該方法が、

有機ヒドロペルオキシドと、適当な溶媒中に該ヒドロペルオキシド及び該過酸化活性物質の存

在下で検知可能な応答を与えることのできる指示薬を含む第1の試薬混合物を調製し；

該第1試薬混合物を担体と接触させ；

該担体を乾燥して、それにより該有機ペルオキシドと該指示薬を包含させ；

Co(II)錯体と、構造式： (ここで、Rは置換若しくは非置換の炭素環又は複素環系の残基で、該環は原子数4～7を有している。)を有する錯合炭化合物との水溶液から成る第2の試薬混合物を調製する；

一連の工程から構成されることを特徴とする方法。

7. 該 Co(II) 錯体が、 $\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_2$ 、コバルト(II)アセチルアセトナト、 $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$ 、 $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{CO}]\text{NO}_3$ 、 $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{CO}_2]\text{NO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 、又はそれらの混合物である特許請求の範囲第6項記載の方法。
8. 該化合物が、6-メトキシキノリン、5,6-ベンゾキノリン、4-アザフルオレン、10H-ピリド[3,2-b]-[1,4]ベンゾチアジ

ン、6-ヒドロキシキノリン又はそれらの混合物である特許請求の範囲第6項記載の方法。

9. 該 Co(II) 錯体が、 $\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_2$  である特許請求の範囲第6項記載の方法。

10. 該化合物が、6-メトキシキノリンである特許請求の範囲第6項記載の方法。

### 3. 発明の詳細な説明

本発明は、試験試料中の過酸化活性物質の測定に関する。更に詳細にいうと、例えば試料中にも存在しているかもしれないアスコルビン酸からのあり得るであろう悪影響に対し抵抗するような測定のための試験具に関する。

多くの分析方法が、尿、糞懸濁物及び胃腸内の含有物のような試料中の過酸化活性物質の存在を検出するために、現在、利用されている。ヘモグロビンとその誘導体は、それらが酵素ペルオキシダーゼと同じ様に挙動するので、そのような“過酸化活性”物質の典型である。このような物質は、類似ペルオキシダーゼ(ブソイドペルオキシダーゼ)類とも言われてきた。過酸化活性物質は、過

酸化物及びベンジジン、o-トリジン、3,3',6,6'-テトラメチルベンジジン、2,7-ジアミノフルオレンのような指示薬化合物又は同様に指示薬物質間の酸化還元(レドックス)反応に触媒作用を及ぼし、そのことによつて色変化のような検出可能な応答を示すという点で酵素類似物である。このことから、試験試料中の潜血の存在を測定するほとんどの方法は、この類似ペルオキシダーゼ活性に依拠している。

色を形成する指示薬の過酸化物による酸化反応に対する酵素様触媒作用に依拠するいくつかの方法が、多年に亘り発達してきた。基本的には、これらの方法は湿式の化学的方法及び試薬を担持した“浸漬-脱取り”型の試験片を包含している。前者のうちの典型的な例は、リチャード・エム・ヘンリー(Richard M. Henry)等の「化学的な化学の基礎及び手法」(ヘガースタウン、メリーランド：ハーバー・アンド・ロー、1974)(Chemical Chemistry Principles and Techniques (Hagerstown, Maryland: Harper and Row,

1974)) 1124～1125頁の中に述べられている。この方法は、水酢酸(緩衝剤)、ジフェニルアミン(指示薬)及び過酸化水素を使用している。このような湿式方法は、分析可能性を立証してきたが、にもかかわらず、それらは明白な欠点を伴うものである。これらの欠点の多くは試薬が安定性に乏しくまた感度が不充分であり、アスコルビン酸の干渉に敏感であるということである。

過酸化活性物質の測定のための第2の方法で、殆んどの臨床検査技師及び分析者によつて現在好まれている方法は、いわゆる“浸漬-脱取り”試験片を用いるものである。典型的なそのような試験具は、ザ・エームス・デイヴィジョン・オブ・マイルス・ラボラトリーズ・インコーポレーテッド(the Ames Division of Miles Laboratories, Inc.)で製造され、ヘマスティクス(HEMASTIX®)の名で販売されている試験片である。これらは、本質的には、プラスチック片又は把手に固定された多孔質の紙片から構成される。この担体(matrix)には、有機ヒドロペルオキシド及びo-ト

リジンの還元化された混合物が含まれている。ヘモグロビン、ミオグロビン、赤血球又は他の類似ペルオキシダーゼを含む液体中に浸漬すると、担体には青色が発色し、その強度は試料中の過酸化活性物質の濃度に比例する。このようにして、担体に発色した色を標準色値と比較することによつて、検査技師は、試料中に存在する分析対象物の量を、半定量的に測定することができる。

試薬片が浸式の化学的方法に優る利点は、主として2点ある。すなわち、試薬片は試薬瓶の調製又は付属装置を必要としないので使用が簡単であり、さらに、試薬瓶のより大きな安定性が与えられるので、その結果、改善された精度、感度及び経済性をもたらす。

しかしながら、尿分析の場合、ビタミンC（アスコルビン酸）を高濃度（単位）で含む最近流行の食物は、そのような食物を摂取した患者が、必ずといつてよい程、尿中アスコルビン酸塩の濃度を不規則に高め、かつ、アスコルビン酸塩が試験を妨害するため、潜血のような尿中成分の分析に

おいて重大な問題を惹起している。

アスコルビン酸塩のような還元剤の悪影響は、早くも1938年に知られていた。アーノ・コーン（B. Kohn）とアーノ・エム・ワトラウス（R. M. Watrous）、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー（*Journal of Biological Chemistry*）、124, 163~168（1938）参照。同じ問題が依然としてこの分野の分析を悩ませているということが、尿中の潜血（類似ペルオキシダーゼ）の分析を行なう場合、正確な潜血の測定を行なうためには、同時にアスコルビン酸の分析を行わねばならないという1979年の提言から明らかである。エル・ニールセン（L. Nielsen）、ピー・ジェイ・ヨルゲンセン（P. J. Jorgensen）とエー・シー・ハンセン（A. C. Hansen）、*Ugeskrift for Læger*, 141, 791~793（1979）参照。

グルコース反応性試薬のような他の試験系を用いてアスコルビン酸塩の妨害作用を排除する多くの試みが文献に報告されているけれども、今日ま

で、それによつて過酸化活性物質の測定がそれらの悪影響からまぬがれたという成功例は1つも報告されていない。グルコース反応系を用いる場合には、アスコルビン酸塩が試薬に到達する前にそれを伊別する方法から、酵素を用いてその場でアスコルビン酸塩を分解する方法まで種々の方法がある。

すなわち、1970年6月16日、ダールグビスト（Dahlqvist）に与えられたカナダ特許第844,564号は、尿中のグルコース測定用の装置又は他の手段を開示している。それは、通常のグルコース反応性試薬瓶が含まれた多孔質部分に加えて、更に尿試験試料を受容する部分を含むものである。この試料受容部分は、イオン交換材を含んでおり、装置内におけるその1つの機能は、尿試料中に存在すると考えられる全てのアスコルビン酸塩を吸着することである。

アスコルビン酸塩の妨害を緩和すべき他の試みは、1979年9月18日ダニング（Danninger）等に与えられた米国特許第4,168,205号内に

反映されている。この文献は、試薬配合物に酵素であるアスコルビン酸塩オキシダーゼを包含せしめることを提案しているが、その理論は、もしアスコルビン酸塩が試料中に存在すれば、それは酵素作用で酸化されて、目的とする分析に悪影響を及ぼさない化合物であるデヒドロアスコルビン酸塩になるであろうというものである。

1968年11月9日クー（Ku）に与えられた米国特許第3,411,887号は、グルコースオキシダーゼのような酵素的な酸化性物質に基づく試験系を用いてアスコルビン酸塩の妨害作用を除去する方法を開示している。アスコルビン酸塩“捕捉系”（“trapping system”）が用いられる。これは、“イオン化した状態において、酸化還元指示薬…と〔アスコルビン酸塩〕の間の値の酸化-還元電位  $E^{\circ}$  red を有するイオン化可能な重金属化合物”から構成される。コバルト、鉄、水銀及びニッケルをはじめとする多くの金属が例として挙げられている。

これらの研究に加えて、グルコース試験に關す

るアスコルビン酸塩の問題に対する注意は、

1. エフチ・ギフホルト (H. Gifford) 等.,  
ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディ  
カル・アソシエーション (J. Amer. Med.  
Assoc.), 178, 149~150 (1961)
2. ビー・オゴーマン (P. O'Gorman) 等.,  
Brit. Med. J., 603~606 (1960)
3. フール・ブランド (R. Brandt) 等., クリ  
ニカ・ジミカ・アクタ (Clin. Chim. Acta),  
51, 103~104 (1974)
4. フール・ブランド (R. Brandt) 等., アメ  
リカン・ジャーナル・クリニカル・パソロジ  
ー (Am. J. Clin. Pathol.), 68, 592~  
594 (1977)

で述べられている。

上記引用のクーパー等と同じように、他の文献は  
コバルトを用いたアスコルビン酸塩の酸化及び酸  
化を取り扱っている。ジー・ブラガクノロ (G.  
Bragagnolo) [Ann. Chim. Applicata, 31,  
350~368, 1941] は、アスコルビン酸の酸化


が金属コバルトの存在下で空気によつて酸化され  
ることを報告した。同様な活性は、ジャーナル・  
オブ・ザ・ケミカル・ソサエティー・オブ・ジャ  
パン [Journal of the Chemical Society of  
Japan 63, 820~826 (1942)] でトモキチ・  
イワサキ (Tomokichi Iwasaki) によつて  $\text{Co}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$  に関して報告されている。

重要なことは、先行技術はグルコース分析を  
広く取り扱っているが、それは、ペルオキシダーゼ  
及び溶血 (ヘモグロビン) のような過酸化活性物  
質の測定におけるアスコルビン酸塩の妨害問題を  
解消する方法について有益な示唆を与えているこ  
とである。米国特許第 3,411,887 号 (上を参  
照) の開示にもかかわらず、この先行技術は疑問  
の余地なく  $\text{Co}(\text{II})$  のような金属イオンが事実類似  
ペルオキシダーゼであることを教示する。例えば、  
 $\text{Co}(\text{II})$  酢酸塩は、クメン過酸化物を触媒的に分解す  
るために商業的に用いられている。ザ・メルク・  
インデックス (The Merck Index), 9 版, 311  
頁 (1976) 参照。一連の  $\text{Co}(\text{II})$  錯体は、クー

ロース., (Kh. Lohs) ., Monatsber. Deut.  
Akad. Wiss. Berlin, 8, 657~659 (1966) (ケ  
ミカルアブストラクト, 67, 120383Z, 1967  
年参照) 過酸化物を触媒的に分解することが報告  
されている。

以下に述べるように、本発明は過酸化活性物質  
を測定するための現状の技術体系を改善するもの  
である。このような系は、必ず、クメンヒドロペ  
ルオキシドのような有機ヒドロペルオキシドとオ  
ートリジン又は 3,3',5,5'-テトラメチルベンジジ  
ンのような酸化還元指示薬から構成される。この  
分析対象物は、それが酵素ペルオキシダーゼに似  
ているので、指示薬と有機ヒドロペルオキシド間  
の反応を起こして色を生じ、その強度が分析対象  
物の強度の指標となる。 $\text{Co}(\text{II})$  錯体によつて示され  
るペルオキシダーゼ活性に関する誤りようのない  
先行技術の教示に照らせば、当業者が、かかる物  
質が過酸化物/指示薬系と相入るものではない  
と考えることは明らかであろう。もしも分析対象  
物を、その存在下で色変化するように意図された

正にその試薬配合物に入れた場合、誤つた正の結  
果が得られることが期待される。これらの結論に  
もかわらず、驚くべきことには、過酸化活性の  
 $\text{Co}(\text{II})$  錯体類が、誤つた正の結果をもたらさないば  
かりか、実際には、かえつて、試薬系を改善して、  
信頼性あるものに、すなわち、アスコルビン酸塩  
の妨害作用に起因する不正確さに鋭敏でなくする  
ことが見出された。

簡単にいえば、本発明は試験試料中の過酸化活  
性物質の存在を検知するための試験具に関し、そ  
の組成物は試料中に存在するアスコルビン酸の妨  
害作用に対して抵抗性を示す。更に、試験具の製  
造方法は、同様に、ここで開示されている発明の  
範囲内にある。この試験具は、有機ヒドロペルオ  
キシドと、過酸化活性物質及び過酸化物の存在下  
で色の変化のような検知可能な応答を示し得る指  
示薬が包含された担体 (carrier matrix) から  
構成される。更に、この担体には  $\text{Co}(\text{II})$  と、構造式  
:  (ここで、R は置換若しくは非置換  
の炭素環又は複素環系の残基である。) を有する

化合物との錯体が包含されている。環は原子数4～7で構成される。


試験組成物中で用いられるべく意図される有機ヒドロペルオキシドは、多くの良く知られた有機ペルオキシド類から選択することができる。しかしながら、それは指示薬の存在下で過酸化活性物質と相互作用して色の変化又は試験組成物によつて吸収若しくは反射される光の量の変化のようを検知可能な応答を示すことができなければならない。好適であることが判っているヒドロペルオキシド類には、1-ブチルヒドロペルオキシド、クメンヒドロペルオキシド、ジイソプロピルベンゼンヒドロペルオキシド、2,5-ジメチルヘキサノ-2,5-ジヒドロペルオキシド、パラメンタンヒドロペルオキシド又はこれらの混合物がある。これらのうち、クメンヒドロペルオキシドが最も好ましいことが判っている。

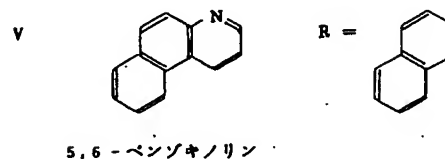
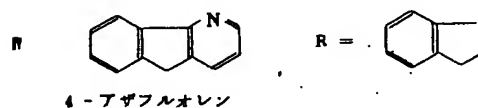
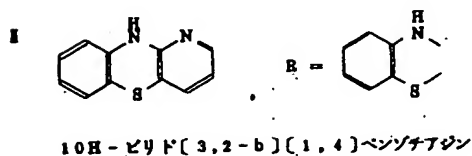
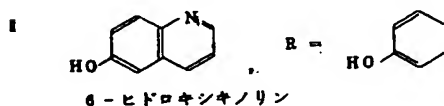
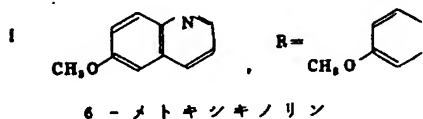
有機ヒドロペルオキシド及び過酸化活性物質の存在下で検知可能な応答を示すことができ、かつそれゆえ本発明に用いて好適な指示薬類は多数存

在する。多くの場合、これらには、いわゆる“ベンジジン型”化合物が含まれる。これらのうち典型的なものは、ベンジジン、o-トリジン、3,3',5,5'-テトラ(低級アルキル)ベンジジン、2,7-ジアミノフルオレン又はこれらの各種割合の混合物である。ここで、“低級アルキル”は、メチル、エチル、n-プロピル及びイソプロピル並びに各種のブチル、ペンチル及びヘキシル異性体をはじめとする、炭素数1～6を有するアルキル基である。

本発明に有用なCo(II)錯体類には、 $\text{Co}(\text{NH}_3)_4\text{Cl}_2$ 、コバルト(II)アセチルアセトナト、 $[\text{Co}(\text{NH}_3)_4\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$ 、 $[\text{Co}(\text{NH}_3)_4\text{CO}_2]\text{NO}_2$ 、 $[\text{Co}(\text{NH}_3)_4\text{CO}_2]\text{NO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 及びその他が含まれる。もちろん、他の多くのCo(II)錯体類も、ここで教示される本発明に適用可能であることが理解される。 $\text{Co}(\text{NH}_3)_4\text{Cl}_2$ がすぐれた結果を示し、アスコルビン酸塩の妨害作用を減少せしめるための好ましい錯体であることが見出された。本発明の好ましい態様において、組成物はクメンヒドロペルオキシド、3,3',5,5'-

テトラメチルベンジジン及び $\text{Co}(\text{NH}_3)_4\text{Cl}_2$ から構成される。

本発明の縮合環化合物は、構造式： (ここで、Rは炭素環又は複素環の残基であり、それは置換又は非置換であつてもよい。)を有するものとして広く定義される。この定義に含まれるものの化合物で上記構造中のRに関する片断は以下のとおりである。



上の化合物は、Rが炭素環(I, II, IV及びV)又は複素環(III)であり得ることを示している。これら化合物の混合物もまた用いることができる。更に、以下の例は、これら化合物の効能のみならず、R残基の置換に関し許容される置換の広い変形をも示している。

試験具の製造は、この組成物を適当な担体に包含せしめることから成り、この後者は多様な形態をとり得る。すなわち、米国特許第3,846,247号はフェルト、多孔質のセラミック片及び織布状又はマット状のガラス繊維の使用を教示する。

更に、米国特許第3,552,928号は、木の綿、布、スポンジ材及び粘土質材料の使用を教示する。担体として合成樹脂のフリース及びガラス繊維のフェルトを使用することが、英国特許第1,369,139号に示唆されている。他の英国特許第1,349,623号は、下層にある紙の担体（マトリックス）の覆いとして、細い繊維からなる光透過性の網の使用を示している。ポリアミド繊維が仏国特許第2,170,397号に教示されている。しかしながら、本発明におけるこれらの提案例の有用性にもかかわらず、従来技術において、担体として主として用いられ、しかも、本発明にとって特に好ましい材料は、伊紙のような吸水性の紙である。かくして、担体として用いるための適切な材質の選択には多くの余地があり、またこの担体が多様な物理的形態をとり得ることが理解できる。これらすべてのタイプのものは、本発明の範囲内にあるものとして意図されている。

本発明の成分は、各種の方法で担体に包含させることができる。それらは、水、ジメチルホルムアミ

ド、クロロホルム、メチレンクロライド、メタノール、シクロヘキサン又はそれらの混合物のような適当な溶媒に溶解又は懸濁することができる。このような溶液又は懸濁液を、ついで、(a)伊紙に含浸せしめるために、(b)適当な担体の上に試薬類が印刷される場合のインクとして、用いることができ、又、(c)ドクターブレードを用いてのように、組成物で担体を被覆することができる。担体と接触されるこれらの及び他の手段は、ここでの発明の範囲内にある。

本発明で好ましい方法は、組成物の溶液又は懸濁液を伊紙に含浸させることであり、好ましい溶媒は、単独で、又はジメチルホルムアミドと混合して用いられる蒸留水又は脱イオン水である。含浸は、一枚の伊紙を溶液中に浸漬し、その浸漬された伊紙を空気乾燥器中で乾燥することによつて達成できる。この乾燥伊紙は、ついで約0.5mm四方の正方形に裁断され、次に約0.6×1.0mmのポリステレン膜片の一端に取りつけられる。取りつけは、ダブル・スティック（Double Stick）と

して知られ、3M社（3M Co.）から入手できるような両面接着テープを用いて達成される。

本発明の試験具を製造するに当つて特に好ましい方法は、有機ヒドロペルオキシドと指示薬とを第1の混合物又は溶液として、伊紙に導入する方法である。引き続き、Co(II)錯体と縮合環化合物とが水性の第2の混合物又は溶液として用いられ、各適用後には乾燥される。担体が第2の浸漬液中のCo(II)錯体で含浸される場合のような2段浸漬法は、アスコルビン酸塩に対する抵抗性は、Co(II)錯体が第1の浸漬液として適用されるか又は全成分が1つの浸漬液として一緒に混合されるかのような方法からも得ることができるけれども、好ましいことであることが見出された。

以下の例は、ここに開示された発明の概念及び利点を一層よく示すために提示される。それらは、本発明品の作り方及び使用方法並びにアスコルビン酸塩に対する、本発明の改良された抵抗性を証明する比較データを提示し、また、本発明の好ましい態様を示す。しかしながら、これらの例は、

決して、本発明の範囲を限定するものと解釈されるべきではない。

#### 例

本発明の試験具の製造において、(多くのCo(II)錯体があるように)多くの縮合環化合物が用いられた。ついでこれらの試験具は、いろいろな量のアスコルビン酸塩と潜血を含有する尿試料中で、これらの試験具の性能におけるアスコルビン酸塩の影響を調べるために試験された。最後に、担体への試薬類の添加の度合い及びアスコルビン酸塩の妨害に対するその試験具の抵抗性を調べるために、実験が行なわれた。

#### A. 各種の縮合環化合物

##### 例1 6-ヒドロキシキノリン

この実験は、6-ヒドロキシキノリンを用いた試験具の製造を例示する。

第1の浸漬液を、蒸留水80mlにCo(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 0.12gを混合して調製した。次に、寸法4×4インチのイートン・アンド・ダイクマン（Eaton and Dickman）の伊紙（No.222）の四角片を第1



浸漬液に浸漬して、95℃で空気乾燥器中で10分間乾燥した。

第2の浸漬液を、以下の成分を表示した順序で混合して調製した。

蒸留水	3.5	ml
クエン酸ナトリウム	1.50	g <sup>**</sup>
クエン酸	1.92	g
トリエタノールアミンホウ酸塩	2.5	g
エチレンジアミンテトラ酢酸 (4ナトリウム塩)	0.10	g
メチルスルホン	4.66	g
ドデシル硫酸ナトリウム	0.52	g
ジメチルホルムアミド	3.5	ml <sup>***</sup>
3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン	0.42	g <sup>***</sup>
クメンヒドロペルオキシド	1.4	g

\*ミリグラム \*\*グラム \*\*\*これらの成分

は混合物に添加される前に一緒に合わされた。

この溶液の10ml試料に0.036gの6-ヒドロキシキノリンを添加した。

ついで、第1浸漬液の残渣を含むワ紙片を、第

2浸漬液の10ml試料に浸漬して空気乾燥器で95℃で10分間乾燥した。

試験具の組立ては、乾燥・含浸された0.6cm角のワ紙を0.6×1.0cmのポリスチレン膜片の一端に、両面接着テープ(3Mカンパニー、ダブル・ステイック415)を用いて取りつけて行なつた。

ヘモグロビンとアスコルビン酸塩の両者を含む尿中でこの試験具の試験では、各種のヘモグロビン濃度に対応する容易に識別可能な色水準が得られる。

## 例2 6-メトキシキノリン

例1の方法に従つて6-メトキシキノリン(8M Q)を含む試験具を製造した。6-ヒドロキシキノリンを用いる代わりに、0.040gの8M Qを10mlの第2浸漬液の試料に添加した。ヘモグロビンとアスコルビン酸塩の両者を含む尿中でこの試験具の試験では、ヘモグロビン濃度に対応する容易に識別可能な色水準が得られる。

## 例3 5,6-ベンゾキノリン

6-ヒドロキシキノリンを用いる代わりに、0.045

gの5,6-ベンゾキノリンを第2浸漬液の10ml試料に添加したことを除いては、例1の方法に従つて試験具を製造した。得られた試験具をヘモグロビンとアスコルビン酸塩を含む尿中で試験すると、ヘモグロビン濃度に対応する容易に識別可能な色水準が観察される。

## 例4 4-アザフルオレン

6-ヒドロキシキノリンを用いる代わりに、0.042gの4-アザフルオレンを第2浸漬液の10ml試料に添加したことを除いては、例1の方法に従つて試験具を製造した。得られた試験具をヘモグロビンとアスコルビン酸塩を含む尿中で試験すると、ヘモグロビン濃度に対応する容易に識別可能な色水準が観察される。

## 例5 10H-ピリド〔3,2-b〕〔1,4〕ベンゾナアジン

6-ヒドロキシキノリンを用いる代わりに、0.050gの10H-ピリド〔3,2-b〕〔1,4〕ベンゾナアジンを第2浸漬液の10ml試料に添加したことを除いては、例1の方法に従つて試験具を製造

した。得られた試験具をヘモグロビンとアスコルビン酸塩を含む尿中で試験すると、ヘモグロビン濃度に対応する容易に識別可能な色水準が観察される。

## 例6 各種のCo(II)錯体

尿中の潜血の分析に伴うアスコルビン酸塩の妨害を緩和することに関するCo(II)錯体の効果を明らかにするため、一連の実験を行なつた。したがつて、試験具は例1によつて製造された。2つの浸漬液の組成は以下のとおりであつた。

### 第1浸漬液

Co(II)錯体(下を参照)	0.0056M
蒸留水	100ml <sup>***</sup>

### 第2浸漬液

蒸留水	50ml
クエン酸ナトリウム	2.13g <sup>***</sup>
クエン酸	2.77g
トリエタノールアミンホウ酸塩	5.00g
メチルスルホン	6.67g
ラウリル硫酸ナトリウム	0.75g

エチレンジアミンテトラ酢酸	0.13g
ジメチルホルムアミド	50.0 ml
6-メトキシキノリン	0.4 ml
クメンヒドロペルオキシド	2.0 ml
3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン	0.60g

・第1浸漬液をCo(II)錯体0.0056モルとするに充分な量。

\*\*\*ミリリットル \*\*\*グラム

別々に試験具を製造し、そこでは第1浸漬液で用いられるCo(II)錯体が、それぞれ、 $\text{Co}(\text{NH}_3)_4\text{Cl}_2$ 、コバルト(II)アセチルアセトナト、 $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$ 、 $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{CO}]\text{NO}_3$ 、又は $[\text{Co}(\text{NH}_3)_4\text{CO}_2]\text{NO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ であつた。得られた試験具は、ヘモグロビンとアスコルビン酸塩の両者を含む尿で試験すると、各Co(II)錯体につき、アスコルビン酸塩の妨害に対する改善された抵抗性を示す。

#### B. アスコルビン酸塩に対する抵抗性の試験

##### 例7. 各種の錯合環化合物の影響

本発明の試験具に対するアスコルビン酸塩の影響を調べるために一連の実験を行なつた。

た色を値4.0とした。

結果は、以下のとおりであつた。

例	尿試料		1分後の肉眼観察結果	
	ヘモグロビン (mg%)	アスコルビン酸 (mg%)	対照	試験具
1	0.135 0.135	2.5	2.0	1.0*
2	0.030 0.030	2.5	2.0	2.0
3	0.030 0.030	2.5	2.0	2.0
4	0.030 0.030	2.5	2.0	2.0
5	0.030 0.030	2.5	2.0	2.0

・異常値

上記データから明らかなように、各種の錯合環化合物を用いて製造した試験具は、比較試験具がアスコルビン酸塩の妨害に対する敏感さを示すのに反し、全てが同じように、アスコルビン酸塩の妨害に対する優れた抵抗性をもっている。

##### 例8. 各種Co(II)錯体の影響

例6で製造された試験具を用いて例7と同様の実験を行なつた。例7の肉眼観察法を用いるかわ

試験具を例1~5で記述したようにして製造した。更に、コバルト錯体を除外した、すなわち、第2浸漬液のみを用いて伊紙担体に含浸せしめた以外は、例6と正に同じ方法で比較試験具を製造した。これらの試験具を、陰性尿及びそれにヒトの全血、アスコルビン酸又はその両者が予め添加された試料を含む試験試料中に浸漬して試験した。

発色を1分後に肉眼で観察し、ついで標準の相対的な色強度値に対応する数値を割り付けた。比較試験片を各種の濃度のヘモグロビンを含有するアスコルビン酸塩を全く含まない尿試料中に浸漬した。標準の色数値は以下のように割り付けた。

ヘモグロビン(mg%)	0	0.015	0.045	0.135	0.405
色数値	0	10	20	30	40

・デシリットル当りのミリグラム

かくして、ヘモグロビンを全く存在せしめない尿試料中に比較試験具を浸漬したときに発生する色を、色数値：0とした；一方、100mg当り0.405mgのヘモグロビンを含む尿によつて発生し

りに、色形成は“迅速走査器 (Rapid Scanner)”として知られる装置を用いて観察された。この装置は、デジタル・エクイップメント・コーポレーション (Digital Equipment Corporation) から入手されるPDP-12コンピュータと接続 (Interface) される走査型反射分光光度計である。この機器は、可視領域での反射スペクトルの迅速測定に用いられる。コンピュータは、スペクトルデータの記憶と演算を行なう。迅速走査器 (Rapid Scanner) での試験片の性能測定は、同一試験片についての肉眼観察にまさつて、以下の利点がある：

1. 試料を取り巻く光源及び条件が変らずに維持される。肉眼観察では、光源が、波長成分にかいてのみならず、観察される試片の位置によつても変動し得る。
2. Rapid Scannerを用いると、検出特性が不変に維持される。肉眼観察では、その検出器 (すなわち、観察者の眼) が人によつて異なり、また、同一人であつても日によつて異なる。

3. Rapid Scanner は、人間による観察よりも、データの一層正確な定量化を行なうことができ、そのため、結果相互間の比較が、肉眼観察によるよりも、一層客観的に行なえるようになる。

この Rapid Scanner は、ザ・エームス・カンパニー・デイヴィジョン・オブ・マイルス・ラボラトリーズ・インコーポレーテッド、エルクハート、インジアナ、U.S.A. (the Ames Division of Miles Laboratories, Inc., Elkhart, Indiana, U.S.A.) によつて組立てられた。そしてそこからスペクトル及び性能特性に関する完全な情報を得ることができる。

Rapid Scanner からの三刺激値 (Tri-stimulus values) は、"Supplement No 2 to Commission Internationale de L'Eclairage (Paris, France) Publication No 15, Colorimetry, (E.-1.3.1), 1971." で決められている規則に従つて、色差値 ( $\Delta E$ ) を演算するために用いられた。それゆえ、以下この装置からのデータは、 $\Delta E$ 又は色

差単位に換算して記録される。

すなわち、例7のようにして、Co(II) 錯体を全く含まない対照試験具を各種の Co(II) 錯体を含む例6の試験具と比較した。この比較は、種々のヘモグロビン濃度の尿でアスコルビン酸塩を含み、また、含まないものを用いて行なつた。

Rapid Scanner によつて得られた色差単位( $\Delta E$ )は、以下のようにヘモグロビン濃度 (アスコルビン酸塩の不存在下で) に対応する：

ヘモグロビン(mg%)	0	0.015	0.030	0.045	0.135
$\Delta E$	0	40	50	58	63

このデータは、対照試験具、すなわち、Co(II) 錯体が存在しないことを除いては例6のようにして製造された試験具を用いて、Rapid Scanner から得られた。

各種 Co(II) 錯体を含む例6の試験具を0.135mg%ヘモグロビンを含む尿試料で、アスコルビン酸を有するものと及び有しないものについて試験したとき、その結果は以下のとおりであつた：

Co(II) 錯体	尿 試 料		Rapid Scannerの結果( $\Delta E$ )	
	ヘモグロビン (mg%)	アスコルビン酸 (mg%)	対 照	試験具
A	0.135	0	63	67
	0.135	50	18	35
B	0.135	0	63	60
	0.135	50	18	27
C	0.135	0	63	62
	0.135	50	18	43
D	0.135	0	63	64
	0.135	50	18	49

A = Co(II)アセチルアセトナト

B = [Co(NH<sub>3</sub>)<sub>5</sub>H<sub>2</sub>O]NO<sub>3</sub>

C = [Co(NH<sub>3</sub>)<sub>5</sub>CO<sub>3</sub>]NO<sub>3</sub>

D = [Co(NH<sub>3</sub>)<sub>5</sub>CO<sub>3</sub>]NO<sub>3</sub>·3H<sub>2</sub>O

表は、Co(II)錯体と錯合環化合物の存在による、アスコルビン酸塩の妨害に対する鋭敏さにおける劇的な減少を明確に示すデータを表現している。

例9.

コバルト(II)の過酸化活性に関して先行文献の教示があるため、例6のようにしてCo(NH<sub>3</sub>)<sub>5</sub>Cl<sub>2</sub>を用いて製造された試験具及び対照試験具(コバルト錯体なしということを除いては例6のようにし

て製造されたもの)を、安定性について、試験した。Co(II)の存在下では組成物中のクメンヒドロペルオキシドが分解されるだろうという予想にもかかわらず、この実験は、試験具間の安定性の相違を、実質上は、なんら示さなかつた。

コバルト含有のものと対照のものを、両者を空気乾燥器中50℃で2週間保存して促進試験に付した。ついで、これらの促進試験に付した試験具ならびに促進試験に付さない試験具を、陰性尿及び種々の量のヒト全血を予め添加した陰性尿中に浸漬した。発色を例6におけるように、すなわち、1分後肉眼で評価した。そのデータは以下のとおりである：

ヘモグロビン (mg%)	対 照		本 発 明	
	1分後の肉眼観察結果		1分後の肉眼観察結果	
	促進試験なし	2週間, 50℃	促進試験なし	2週間, 50℃
0.000	0	0	0	0
0.015	20	19	20	18
0.030	22	21	21	21
0.045	25	25	25	23
0.135	30	32	32	30
0.405	40	40	40	40

上のデータから周知できるように、過酸化水素とCo(II)が、50℃で2週間の保存後でさえ、両立しないということが全くないことが明らかである。更に、コバルト含有の試験具は、コバルト(II)の存在しない対照試験具と同等の感度を有する。

### C. 試験具の製造方法

#### 例10.

試験具の製造方法を調べ、担体に対する試薬類の添加順序を変えたときの影響を明瞭にするために、実験を行なった。第1浸漬液(例6)としてCo(II)錯体を添加して試験具を製造するときは、優れたアスコルビン酸塩に対する抵抗性が認められる。しかしながら、添加の順序を逆にしたとき、すなわち、錯体が第2浸漬液として添加された場合には、アスコルビン酸塩に対する抵抗性は消滅していくことが観察された。驚くべきことには、縮合環化合物が第2浸漬液でCo(II)と一緒に含まれているときは、アスコルビン酸塩に対する抵抗性が例6のようにして製造された試験具の水準に回復する。

クエン酸	1.38g
トリエタノールアミン酢酸塩	3.33g
メチルスルホン	3.33g
ジメチルホルムアミド	25.0ml
6-メトキシキノリン	200mg
クメンヒドロペルオキシド	1.0ml
3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン	0.30g
この溶液20mlにラクリル酸	
ナトリウムを加えた	0.20g
エチレンジアミンテトラ酢酸	0.01g

4ナトリウム塩の第2浸漬液をつくるため。

乾燥した、コバルト含浸の伊紙を第2浸漬液に浸漬し、ついで前と同様に、90℃で10分間乾燥した。

この方法でつくられた試験具を、尿中ヘモグロビン进行分析のために用いたときのアスコルビン酸塩の妨害作用に対するそれらの抵抗性を調べるために、下に示したようにして試験を行なった。結果は、以下のとおりである。

3セットの試験具を製造した。セット(a)は、 $\text{Co}(\text{NH}_3)_4\text{Cl}_2$ を伊紙担体に第1浸漬液として包含させ、縮合環化合物を含む残りの成分を第2浸漬液として添加して製造した。セット(b)の試験具は、セット(a)の逆の添加順序、すなわち、コバルト錯体を第2浸漬液とし、他の成分は第1浸漬液にして製造した。セット(c)は、第2浸漬液がコバルト錯体と縮合環化合物の両者から成る場合に製造された試験具を表わす。

#### セット(a) — 第1浸漬液中のCo(II)

試験具を製造し、そこでは $\text{Co}(\text{NH}_3)_4\text{Cl}_2$ が、0.13gの $\text{Co}(\text{NH}_3)_4\text{Cl}_2$ を10mlの蒸留水に溶解して成る組成の水性第1浸漬液として添加された。この溶液を実験室用の伊紙片(イートン・アンド・グライクマンNo.237)に含浸させて用い、ついで10分間、90℃で空気乾燥器中で乾燥した。

表示した順序で以下の成分を組合せて第2浸漬液を調製した：

蒸留水	25 ml
クエン酸ナトリウム	1.07g

尿試料		肉眼観察の結果
ヘモグロビン (mg%)	アスコルビン酸 (mg%)	
0	0	3
0.135	0	30
0.135	50	20

このデータは良好なアスコルビン酸塩抵抗性、すなわち、ヘモグロビン分析に伴う比較的小さな妨害作用を示している。

#### セット(b) — 第2浸漬液中のCo(II)

試験具の第2のセットを製造し、ここではコバルト錯体を第2浸漬液として添加した。この実験では、上でセット(a)のために用いた伊紙片を第2浸漬液に浸漬し、乾燥し、ついでコバルトを含む第1浸漬液に浸漬して再び乾燥した。添加の順序を逆にしている以外、その方法はセット(a)で適用したことに同じである。

ヘモグロビン及び/又はアスコルビン酸塩を含む、又は含まない尿で、例4のようにして試験したとき、その結果は以下のとおりであつた：

尿試料		肉眼観察の結果
ヘモグロビン (mg%)	アスコルビン酸 (mg%)	
0	0	1
0.135	0	28
0.135	5	5

このデータは、試験試料中のアスコルビン酸塩による妨害作用に対し劇的な鋭敏性を示している。

セット(c) — 第2浸漬液中のCo(II)及び錯合環化合物

試験具の第3のセットを製造し、そこでは第2浸漬液はコバルト錯体と錯合環化合物の両者を含んでいた。

表示した順序で以下の成分を組合せて第1浸漬液を調製した：

蒸留水	50 ml
クエン酸ナトリウム	2.13 g
クエン酸	2.77 g
トリエタノールアミンホウ酸塩	6.67 g
エチレンジアミンテトラ酢酸4ナトリウム	0.07 g

メチルスルホン 6.67 g

ラウリル硫酸ナトリウム 1.00 g

この溶液の試料10 mlに、ジメチルホルムアミド10 ml、クメンヒドロペルオキシド0.4 g及び3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン0.12 gを添加した。

実験用伊紙片(イートン・アンド・ダイクマン No. 222)を第1浸漬液に浸漬し、空気乾燥器内で、10分間、95℃で乾燥し、それから乾燥伊紙を第2浸漬液に浸漬した。

第2浸漬液は、 $\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_2$  0.24 gを蒸留水80 mlに溶解して調製した。この溶液10 mlにジメチルホルムアミド10 mlを、つづいて6-メトキシキノリン80 mlを添加した。第2浸漬液に浸漬したのにつづいて、この伊紙を再び10分間95℃で乾燥した。

アスコルビン酸塩を含む、又は含まないヘモグロビンを含む尿中にこの試験伊紙を浸漬すると、以下のデータが得られた：

尿試料		肉眼観察の結果
ヘモグロビン (mg%)	アスコルビン酸 (mg%)	
0.135	0	5
0.135	0	40*
0.135	50	38*

\*これらの試験具は、上記のセット(a)及びセット(b)の試験具より感度がよいことに注意されたい。これはたぶん、イー・アンド・デー-237の代りにイー・アンド・デー-222伊紙を用いたからである。

このデータは、セット(c)の試験具を尿中ヘモグロビンの分析に用いると、アスコルビン酸塩の妨害作用に対し、非常な程度の抵抗性を有することを示している。